Anti-HIV TETRA ELISA

Test ELISA pour l'analyse qualitative d'anticorps anti-HIV dans du sérum ou du plasma humain

Conditionnement

REF [1]	807 007	96 tests	IVD	coffret de tests complets
REF	807 008	480 tests	IVD	coffret de tests complets

Usage prévu

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) se caractérise par une issue fatale. L'agent pathogène du SIDA a été identifié comme étant le virus de l'immunodéficience humaine du type 1 (HIV-1) et du type 2 (HIV-2) (2). Le HIV se transmet par contact sexuel entre des personnes infectées par le HIV, par des produits sanguins contaminés par le HIV, par des instruments médicaux (par exemple des aiguilles pour injections) mal désinfectés et par transmission de la mère à l'enfant. Le test ELISA (titrage immuno-enzymatique utilisant un antigène adsorbé) est un test maintenant bien établi pour la détection des anticorps anti-HIV dans le sérum ou le plasma humain. Cependant, un test ELISA n'assure pas 100% de sécurité dans le diagnostic du HIV. Par conséquent, un test ELISA positif pour un anticorps doit être confirmé en utilisant une autre méthode plus spécifique (transfert du type western, PCR). Un résultat ELISA négatif, n'exclut pas totalement, par ailleurs, la possibilité de la présence de HIV-1/2.

Principe du test - analyse de troisième génération -

Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest est un dosage immunoenzymatique du type sandwich très sensible de troisième génération pour le diagnostic *in vitro* IVD. Les anticorps réagissent avec les antigènes de la MTP, qui est tapissée par trois protéines recombinantes (rec.) et un peptide de virus HIV (3). Si des anticorps HIV-1/2 sont présents dans l'échantillon à tester, ils se lieront à la MTP. Toute matière liée de façon non-spécifique est éliminée par une procédure de lavage, puis le conjugué d'antigènes est ajouté. Le conjugué est un mélange de 2 protéines recombinantes et de 2 peptides des régions GAG/ENV de HIV-1 et HIV-2, marqués directement par de la peroxydase de raifort. Le conjugué d'enzyme non-lié est éliminé dans une autre étape de lavage. La présence de complexes anticorps antigène liés est démontrée en utilisant une réaction enzymatique, qui donne un produit coloré, avec la TMB (3,3´5,5´-tétraméthylbenzidine) comme substrat. On arrête la réaction enzymatique en utilisant de l'acide sulfurique et on lit la densité optique (DO) à 450 nm dans un photomètre spectral contre une longueur d'onde de référence de 615-690 nm.

Contenu des trousses de 96x et 480x test

	96 x	480 x	
MTP	1	5	**Microplaque** 12 barrettes sécables de 8 puits chacune, tapissés des gp41, gp36 et p24 rec. de l'antigène HIV avec un peptide de HIV, gp41, (concentration: > 0.5 µg/ml).
NC	3,8ml	3,8ml	**Contrôle négatif pour HIV** (prêt à l'emploi) Echantillon de lapin Anti-HIV négatif conservateur: 0,005% de gentamicine, 0,05% de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
PC	3ml	3ml	**Contrôle positif pour HIV** (prêt à l'emploi) Echantillon polyclonal de lapin Anti-HIV positif, conservateur: 0,005% de gentamicine, 0,05% de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
CONJ	0,5ml	3 x 0,5ml	**Concentré de conjugué** (concentré 50 x) gp41, p24 rec. de l'antigène de HIV et peptides gp41 et gp36, de HIV marqués par la peroxydase, conservateur: 0,2% de Procline-300®, 0,01% de gentamicine.
DIL	1 x 8ml	1 x 32ml	**Diluant de l'échantillon** (prêt à l'emploi) conservateur: 0,2 % de Procline-300®, 200U/ml de pénicilline V et streptomycine
CONJDIL	1 x 15ml	2 x 30ml	**Diluant du conjugué** (prêt à l'emploi) conservateur: 0,2% de Procline-300®, 0,01% de gentamicine.
WB	1 x 50ml	3 x 50ml	**Tampon de lavage** (concentré 25 x), conservateur: 0,1% de Kathon®, Tween <3%
SUB	1 x 16ml	4 x 16ml	**Solution de substrat** (prête à l'emploi) Solution de 3,3´,5,5´-tétraméthylbenzidine (TMB) < 0,05 % dans H_2O. Voir avertissement et précautions.
STOP	1 x 30ml	2 x 30ml	**Solution d'arrêt** (prête à l'emploi) Acide sulfurique < 1 N H_2SO_4
SB	1	1	**Sachet de conservation:** sachet en polyéthylène pour conserver les barrettes de microplaques inutilisées.
FOL	3	12	**Feuilles transparentes auto-adhésives:** Feuilles transparentes auto-adhésives pour recouvrir les puits des microplaques pendant l'incubation.
	1	1	**Notice du coffret**

Conservateurs: concentration totale < 0,8%

Matériaux nécessaires, mais non fournis avec la trousse

micropipettes, photomètre spectral (450 nm, longueur d'onde de référence 615 – 690 nm), laveur de microplaques d'usage courant (lavage de fond), incubateur à 37°C pour les MTP ELISA. En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

Avertissement et précautions

Ne pas incorporer de réactifs. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Traiter les échantillons, les contrôles et les matières utilisées pour le test comme des produits potentiellement infectieux et prendre les mesures de sécurité appropriées. Les contrôles sont négatifs pour anti-HIV 1/2, anti-HCV, HB_SAg, anti-syphilis et les transaminases élevées. Ne pas pipeter à la bouche. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Décontaminer les matières liquides et non-combustibles avec de l'hypochlorite de sodium (concentration finale: 3 %, temps d'action, au moins 30 minutes). Neutraliser obligatoirement les déchets liquides contenant des acides avant leur élimination. Autoclaver obligatoirement les MTP utilisées et toutes les matières à réemployer pendant 1 heure à 121°C. La SUB est sensible à la lumière et doit être mise à l'abri de celle-ci. Le test doit être exécuté par des techniciens de laboratoire bien formés et agréés. Exécuter le test dans des conditions aseptiques et microbiologiquement contrôlées. Si le coffret d'origine est endommagé, en informer le fabricant.

Stockage

Les réactifs, s'ils sont stockés à 2...8°C, sont stables jusqu'aux dates de péremption figurant sur chaque étiquette individuelle. Après ouverture des réactifs, ceux-ci doivent être utilisés dans les 30 jours. En cas de répétition de tests, conserver les réactifs, immédiatement après usage, à 2...8°C. Enfermer la MTP dans un sachet d'aluminium avec un déshydratant et la mettre à la température ambiante avant ouverture. Remettre les barrettes inutilisées avec le déshydratant dans le sachet refermable et les conserver ainsi à 2...8°C. Ne pas toucher avec les doigts le bord supérieur ni le fond des puits.

Préparation des réactifs

Diluer le concentré de tampon de lavage avec de l'eau déminéralisée ou désionisée (par exemple, diluer 40 ml à 1 litre). Le tampon ainsi préparé est stable pendant une semaine, conservé à 18-25°C. En cas de cristallisation après stockage à 2...8°C, remettre le concentré de tampon de lavage en solution en le chauffant à 37°C. Bien mélanger le tampon avant de le diluer.

Diluer le conjugué concentré au 1:50 dans des conditions aseptiques (par exemple, 100 µl de conjugué + 4,9 ml de diluant du conjugué). Bien secouer le concentré avant dilution (en mouillant bien toutes les parois intérieures du flacon) pour récupérer toute condensation. Le conjugué préparé, après dilution, peut se conserver pendant 4 semaines à 2...8°C dans un récipient fermé à l'abri de la lumière. Tous les autres composants de la trousse de test sont prêts à l'emploi.

Tous les réactifs sont spécifiques d'un lot ; ne pas les utiliser avec des trousses d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Préparation des échantillons

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma frais, sans hémolyse. Des échantillons de sérum ou de plasma à forte lipémie, ictériques ou à contamination microbienne et des préparations d'immunoglobuline concentrées risquent de donner des résultats de test non fiables. Eviter de congeler et décongeler les échantillons à plusieurs reprises. Si les échantillons doivent être transportés, les emballer conformément aux exigences réglementaires pour le transport de matières infectieuses. Ne pas inactiver les échantillons, car il pourrait se produire des réactions non-spécifiques.

Performance du test

Suivre strictement le protocole (voir la procédure de pipetage). Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante (18-25°C) avant utilisation. Diluer tous les contrôles et échantillons dans le rapport 3:4 dans la microplaque en utilisant le diluant de l'échantillon: Distribuer 50µl de DIL dans chaque puits. Le blanc dans A 1 est utilisé comme contrôle de substrat et n'est donc rempli que par 50 µl de DIL. Pipeter 150 µl de NC dans chacun des puits B1 C1. Pipeter 150 µl de PC dans chacun des puits D1 et E1. Pipeter les échantillons dans les puits à partir de F1. Finalement, bien mélanger.

La dilution directe dans la microplaque est particulièrement appropriée en cas d'utilisation d'un système de manipulation des liquides automatisé. Si la dilution directe est exécutée manuellement, prendre les précautions suivantes pour éviter une fixation non-spécifique de protéines:

a) premièrement, distribuer les 50 µl de DIL dans les puits, puis ajouter les 150 µL d'échantillon ou de contrôle et
b) pendant l'addition des 150 µl de l'échantillon ou du contrôle, mélanger trois fois avec le DIL.

Procédure de lavage

La procédure de lavage constitue un point critique. Un lavage insuffisant entraînerait une mauvaise précision et des réactions non-spécifiques.

W1: laver 5 fois avec le tampon de lavage. Pour cela, éliminer le liquide du puits et distribuer 300 µl de tampon de lavage. Remplir le puits avec au moins 250 µl de tampon de lavage (volume total 550). Répéter cette procédure de lavage 5 fois. Tapoter brièvement sur la plaque après lavage. Ne pas laisser la plaque sécher.

Evaluation

Soustraire le blanc de toutes les valeurs des contrôles et des échantillons. L'absorption du blanc doit être inférieure à une DO de 0,100. Les valeurs des contrôles doivent satisfaire les critères suivants:

DO moyenne des contrôles négatifs: ≤ 0,180
DO moyenne des contrôles positifs: ≥ 0,600

Calcul de la valeur seuil et de la zone grise
La valeur seuil est calculée à partir de la DO moyenne des témoins négatifs (NCx) à laquelle on ajoute 0,250. Valeur seuil = (NCx) + 0,250. La zone grise s'étend entre la valeur seuil et la valeur seuil moins 10%.

Interprétation des résultats
Les échantillons ayant une valeur d'absorption inférieure à la zone grise sont considérés comme négatifs. Si un échantillon a une valeur d'absorption égale ou supérieure à la valeur seuil, il est considéré comme positif pour les anticorps spécifiques du HIV. Les échantillons ayant une DO dans la zone grise sont considérés comme douteux. Il est recommandé de recommencer l'analyse de l'échantillon dans un tel cas.

Procédure de pipetage pour la détermination de la performance du test

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1	B1/ C1	D1/ E1	G1... échantillon
Blanc	50 DIL			
NC double test	--	50 DIL 150 NC	--	--
PC double test	--	--	50 DIL 150 PC	--
Echantillon	--	--	--	50 DIL 150
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 2 mn**, 37 ± 1 °C				
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**puits [µl]**			
CONJ pas dans le blanc	--	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 2 mn**, 37 ± 1 °C				
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation **30 ± 2 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité				
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15 mn suivant l'arrêt, à 450 nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence: 615 - 690 nm).				

* En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

Données de performance
Sensibilité
Les résultats suivants ont été obtenus pour la sensibilité du test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest: tous les sérums des 460 échantillons HIV-1 positifs et des 200 échantillons HIV-2 positifs ont été trouvés positifs. La sensibilité du test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest déterminée en testant 21 panels de séroconversion est en bonne corrélation avec les tests comparatifs Anti-HIV. Pour l'analyse de la capacité de détection d'anticorps dirigés contre différents sous-types de HIV, les sérums suivants ont été testés: sous-type A (6), B (9), C (5), D (4), E (3), F (3), E/F (3), O (10). Tous ces sérums ont donné un résultat positif. La sensibilité était de 100%.
Spécificité
La spécificité du test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest a été étudiée par un laboratoire indépendant. Sur 4133 échantillons de sérum provenant de donneurs de sang sains, 7 échantillons ont été trouvés réactifs. La spécificité est de 99,83%.
Echantillons sérum/plasma
Les échantillons de sérum et de plasma (citrate/EDTA) de 165 donneurs de sang négatifs pour le HIV ont été testés en parallèle par le test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest. Aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs de DO mesurées sur l'échantillon de sérum et de plasma correspondant. En outre, un sérum humain positif pour un anticorps anti-HIV a été additionné à 45 échantillons de sérum/plasma. Les valeurs d'absorption des paires d'échantillons n'ont pas présenté de différences significatives.
Précision
Dans une étude, la variabilité intra-séries du test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest a été étudiée en pipetant des échantillons réactifs dans 45 cavités d'une microplaque. Le coefficient de variation suivant (CV) a été déterminé:

Echantillon	CV
Très réactif	3,9%
Modérément réactif	10,1%

La variabilité inter-séries a été mesurée en testant 2 échantillons dans les plages des DO moyennes et élevées, 16 fois pendant 3 jours, indépendamment l'un de l'autre. Le coefficient de variation suivant (CV) a été déterminé:

Echantillon	CV
Très réactif	8,7%
Modérément réactif	10,4%

Réactivité croisée
Le test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest a été appliqué aux 151 échantillons suivants risquant de donner des réactions croisées: positifs pour l'anti-facteur rhumatoïde (13), positifs pour l'anticorps antinucléaire (ANA) (8), positifs pour l'anti-virus de l'hépatite A (17), positifs pour l'anti-virus de l'hépatite B (22), positifs pour l'anti-virus de l'hépatite C (15), positifs pour l'anti-HTLV I/II (10), positifs pour l'anti-virus d'Epstein Barr (37), positifs pour l'anti-virus de la varicelle (11), positifs pour l'anti-E. coli (18). Aucune réactivité croisée n'a pu être détectée pour l'Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest. En outre, des échantillons contenant „p24 isolé" (23) obtenus à partir de donneurs de sang sains sans aucune corrélation avec le HIV ont été testés. Ces sérums donnaient des bandes hors de la région GAG (p24, p40, p50) d'après l'analyse par transfert de western. L'acide nucléaire spécifique du HIV n'a pas pu être détecté dans ces sérums. Seuls 3 sur les 23 échantillons „p24 isolé" ont été trouvé positifs (13 %) avec l'Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest. En cas de résultat positif dans le test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest, l'identification de l'échantillon concerné comme étant un „p24 isolé" peut être réalisée par un transfert de western.

Limitations de la méthode
Un résultat négatif dans le test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest n'exclut pas avec une certitude absolue la possibilité d'une infection par le HIV. Les méthodes complémentaires pouvant être utilisées incluent le transfert de western, la détermination de p24 et les techniques des acides nucléiques (NAT). L'influence des interférences sur la réactivité du test Anti-HIV TETRA ELISA de Biotest a été étudiée. On a ainsi testé les cas de sérums ictériques, hémolytiques et lipémiques en ajoutant de la bilirubine, de l'hémoglobine et des triglycérides dans plusieurs séries de titrage. Les niveaux de concentration suivants ont été étudiés:

Bilirubine	0,02 - 0,16 mg/ml
Triglycérides	5 – 80 mg/ml
Hémoglobine	0,2 – 4 mg/ml

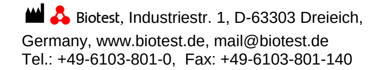
Dans le cas de la bilirubine et des triglycérides, aucune variation de DO n'a été observée dans l'ensemble du domaine de concentration pour des échantillons de sérum aussi bien négatifs que positifs pour des anticorps anti-HIV. Dans le cas de l'hémoglobine, on n'a observé d'augmentation de l'activité de base qu'à partir d'une augmentation de la concentration of 2 mg/ml dans le cas de sérums négatifs pour les anticorps anti-HIV. Dans le cas d'un sérum très hémolytique, par conséquent, il faut prendre en compte la possibilité d'un résultat faux positif. Les sérums hémolytiques devront par conséquent être testés en utilisant une seconde méthode ELISA ou un test de confirmation (transfert de western, NAT) en cas d'obtention à nouveau de résultats positifs. Dans le cas d'échantillons positifs pour les anticorps anti-HIV, aucune différence significative de la réactivité du test en fonction de la concentration d'hémoglobine n'a été observée.

Littérature

1. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
2. Promoting early HIV diagnosis et entry into care. Valdiserri R. O. et coll *AIDS*, 13: 2317-2330,1999 (Revue éditoriale).
3. Evaluation of a new third generation HIV-1/2 Immunoassay. Lang, D. et coll. *Clin. Lab*. 45, 1999.

Guide de dépannage
1) Taux élevé, et inattendu, de résultats réactifs. Des échantillons ou des contrôles ont été pipetés avant le pipetage de DIL ou bien le mélange a été insuffisant.
2) Valeur moyenne du blanc supérieure au critère de validité, DO ≧ 0,100:
   a) SUB devenue bleue par oxydation ou contamination.
   b) Erreur de lavage: Effectuer l'étape des 5 cycles de lavage. Utiliser le WB de Biotest contenu dans la trousse.
   c) Erreur d'incubation: température trop haute, durée d'incubation dépassée ou plaque non incubée directement après la fin du pipetage.
   d) Erreur de longueur d'onde: une mesure sans filtre de référence augmentera les valeurs de DO d'approximativement + 0,120
3) Coloration jaune dans tous les puits: (voir 2a, 2b)
   a) WB contaminé ; préparer un nouveau tampon de lavage
   b) DIL ou CONJ contaminé ; répéter le test avec des réactifs provenant de flacons encore fermés. Utiliser les réactifs dans des conditions plus aseptiques.
4) Valeur de DO moyenne de PC inférieure à < 0,600:
   a) Date de péremption dépassée.
   b) Température trop basse ou durée d'incubation trop faible.
   c) Erreur de lavage: lavage trop intensif ou contact mécanique entre le distributeur et la phase solide du puits.
   d) Contamination de PC ou 3b.
5) Valeur de DO moyenne de NC supérieure à > 1,80: (voir 1 et 2 a-d)
   a) NC n'a pas été pipeté après le pipetage des échantillons ; pipeter tous les échantillons avant de pipeter les blancs et les contrôles.
   b) Contamination par le couvercle du PC




Biotest, Industriestr. 1, D-63303 Dreieich, Germany, www.biotest.de, mail@biotest.de
Tel.: +49-6103-801-0, Fax: +49-6103-801-140

CE 0197